

DIK RUTIN



LAPORAN KEGIATAN

JUDUL PENELITIAN :
PENGARUH EKSTRAK METANOL BUAH MAKASAR (*Brucea javanica* L)
DAN UBI KAYU (*Ipomea batatas* L) TERHADAP PERUBAHAN
EKSPRESI GEN p53 SEL HELA

Oleh :

Praba Ginanjar, SKM, M. Biomed
Drh. Dwi Sutiningsih

Dibiayai dengan dana DIK Rutin Universitas Diponegoro Tahun Anggaran 2004, sesuai dengan Perjanjian Tugas Pelaksanaan Penelitian Para Dosen Universitas Diponegoro, Nomor: 1269a/J07.11 /PG/2004, tanggal 5 Mei 2004

FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
OKTOBER, 2004

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN DIK RUTIN**

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1.a. Judul Penelitian | : Pengaruh Ekstrak Metanol Buah Makasar (<i>Brucea javanica</i> L Merr) dan Ubi Kayu (<i>Ipomea batatas</i> L) terhadap Perubahan Ekspresi Gen p53 Sel Hela. |
| b. Kategori Penelitian | : Penerapan Iptek |
| 2. Ketua Peneliti | : |
| a. Nama Lengkap & Gelar | : Praba Ginanjar, SKM, M.Biomed |
| b. Jenis Kelamin | : Perempuan |
| c. Pangkat/Golongan/NIP | : Penata Muda/IIIa/132 163 502 |
| d. Jabatan Fungsional | : Asisten ahli |
| e. Fakultas | : Kesehatan masyarakat |
| f. Universitas | : Diponegoro |
| g. Bidang Ilmu yang Diteliti | : Kesehatan |
| 3. Jumlah Tim Peneliti | : 2 orang |
| 4. Lokasi Penelitian | : Yogyakarta |
| 5. Kerja sama dengan instansi lain | : - |
| 6. Jangka Waktu Penelitian | : 6 (enam) bulan |
| 7. Biaya yang Diperlukan | : Rp. 3.000.000,-
(Tiga juta rupiah) |

Semarang, 29 Oktober 2004



(dr. Ari Suwondo, MPH)
NIP. 131 610 342

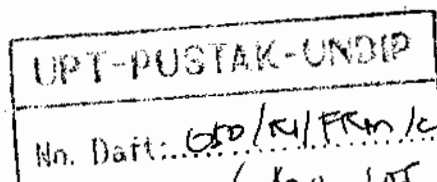
Ketua Peneliti,

(Praba Ginanjar, SKM, M.Biomed)
NIP. 132 163 502



Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian Undip

(Prof. Dr. Igg. Kiwanto, Sp.BD)
NIP. 130 529 454



RINGKASAN

PENGARUH EKSTRAK METANOL BUAH MAKASAR (*Brucea javanica* L Merr) DAN UBI RAMBAT (*Ipomea batatas* L) TERHADAP PERUBAHAN EKSPRESI GEN p53 SEL HELA

**Praba Ginanjar, Dwi Sutiningsih
Tahun 2004**

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dunia baik di negara berkembang maupun negara maju. Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO) disebutkan bahwa 12% kematian yang terjadi dari 50 juta kematian dalam tahun 1997 disebabkan oleh kanker. Sebesar duapertiga dari jumlah tersebut terjadi di negara berkembang (WHO, 1998). Lebih jauh dilaporkan oleh *America Cancer Society* sekitar 1500 orang setiap hari meninggal karena kanker (Anonim, 1995). Menurut WHO (1998), kanker merupakan penyebab kematian nomor dua setelah kardiovaskuler diantara penyakit tidak menular (*non communicable disease* = NCD). Kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker serviks dengan frekuensi relatif 29,63% (Prajatmo et al., 1999). Kanker serviks telah menjadi penyebab kematian kedua setelah kanker payudara (Longo, 1998).

Berbagai cara penyembuhan telah dilakukan untuk melawan kanker seperti pembedahan, penyinaran, kemoterapi dan imunoterapi namun demikian masing-masing cara mempunyai kelemahan sendiri sehingga pengobatan kanker belum memuaskan hingga saat ini (Hoffman, 1999). Penggunaan kemoterapi antikanker belum memberikan hasil optimal karena obat tersebut bekerja tidak spesifik. Masalah lain dalam kemoterapi adalah timbulnya sel kanker yang resisten terhadap antikanker tersebut yang membuat antikanker tersebut tidak sensitif lagi. Dengan demikian usaha menemukan antikanker yang lebih spesifik dan sensitif sangat diperlukan.

Penelitian untuk mengkaji aktivitas antikanker dari tanaman yang diduga mempunyai khasiat antikanker penting dilakukan dalam usaha mencari dasar ilmiah penggunaan tanaman tersebut untuk pengobatan kanker oleh masyarakat. Mekanisme kematian sel kanker melalui ekspresi gen (protein) p53 perlu diteliti untuk mengetahui aktivitas biologis ekstrak metanol *Brucea javanica* (L) Merr dan *Ipomea batatas* (L)

terhadap sel kanker, sehingga diketahui kemampuannya sebagai antikanker serta untuk memperkirakan dosis yang akan digunakan.

Ke dalam mikrokultur 96 sumuran yang mengandung 100 ul sel uji dengan kerapatan 2×10^4 , ditambahkan 100 ul senyawa uji dengan konsentrasi dibawah nilai LC_{50} . Kemudian diinkubasikan dalam inkubator dengan aliran CO_2 pada suhu 37 C selama 24 jam. Setelah diinkubasi semalam, sel dari masing-masing sumuran sebanyak 200 ul diambil dan masukkan dalam *ependoff*, kemudian disentrifugasi 1200 rpm selama 5 menit. Cairan supernatan dibuang, sisakan peletnya, kemudian diresuspensi. Ambil suspensi sel tersebut dan letakkan di atas gelas obyek yang telah dilapisi *poly L lysine*. Kemudian sel difiksasi dengan aseton selama 10 menit. Cuci dengan PBS selama 5 menit. Tetesi dengan hidrogen peroksidase 0,1 % selama 10 menit. Kemudian cuci dengan air mengalir. Cuci dengan PBS 1x 5 menit. Tetesi dengan serum normal (atau RTU serum normal kuda) selama 10 menit masing-masing 100 ul. Kemudian dibersihkan tanpa pencucian dengan air. Tetesi dengan antibodi primer yaitu anti p53 protein dan biarkan selama 24 jam. Kemudian cuci dengan PBS 2x5 menit. Tetesi dengan *biotinylated secondary antibody* selama 10 menit. Cuci dengan PBS 2x5 menit. Tetesi / inkubasi dengan *Avidin Biotin enzym reagent* (atau RTU *streptavidin/peroxidase complex*) selama 10 menit. Cuci dengan PBS 2x5 menit. Inkubasi dengan peroxidase substrat (DAB) selama 10 menit atau sampai pewarnaan timbul. Cuci dengan air mengalir. *Counterstain* dengan menggunakan hematoksilin selama 10 sampai 20 detik. Kemudian cuci dengan air mengalir. Dehidrasi dengan menggunakan etanol 95% kemudian xilen masing-masing selama 10 menit. Teteskan media *mounting* kemudian tutup dengan *deck glass*. Amati hasilnya dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Sel yang tercat positif protein p53 menunjukkan adanya inti atau sitoplasma yang tercat dengan warna coklat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat dapat eningkatkan ekspresi protein p53 sel Hela. Ada kecenderungan peningkatan ekspresi protein p53 positif pada kelompok perlakuan ekstrak metanol ubi rambat (41%) dan buah makasar (75%) dibanding kontrol (20,33%), demikian juga untuk sel Hela yang mengekspresikan positif kuat protein p53 terlihat adanya peningkatan pada kelompok perlakuan dengan ekstrak metanol ubi rambat (32,52%) dan buah makasar

(72%) dibandingkan kontrol (18,03%) (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol ubi rambat dan buah makasar dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan meningkatkan peran gen p53 sebagai gen supresor tumor. Gen p53 menghambat pertumbuhan sel kanker dengan mengaktifkan sekuen spesifik faktor transkripsi dan memacu transkripsi gen-gen yang mengkode protein yang berperan dalam penghambatan pertumbuhan seperti p21 WAF1/CIP1. Ekspresi yang berlebihan p21 dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan secara langsung pada sel kanker (Giaccia *et al.*, 1998). Ekstrak metanol buah makasar memiliki kemampuan yang lebih baik dalam mengekspresikan protein p53 sel HeLa dibanding ekstrak metanol ubi rambat. Kemungkinan disebabkan kandungan senyawa aktif : brusentin, bruseantinol, yang merupakan senyawa aktif yang berfungsi sebagai antikanker.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol buah makasar (*B.javanica* L Merr) dan ubi rambat (*I.batatas* L) dapat menginduksi peningkatan ekspresi protein p53 sel HeLa, akan tetapi kemampuan ekstrak metanol buah makasar (*B. javanica* L Merr) dalam meningkatkan ekspresi protein p53 sel HeLa lebih baik dibandingkan ubi rambat (*I. batatas* L)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas bimbinganNya sehingga kami dapat menyelesaikan laporan akhir penelitian yang berjudul ” **Pengaruh Ekstrak Metanol Buah Makasar (*Brucea javanica* L Merr) dan Ubi Rambat (*Ipomea batatas* L) terhadap Perubahan Ekspresi Gen p53 Sel Hela** ”. Laporan penelitian ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa dukungan dan bantuan dari berbagai pihak.

Untuk itu pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih kepada :

1. dr. Ludfi Santoso MSc, DTM & H selaku Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro.
2. Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro Semarang yang telah memberikan bantuan DIK RUTIN demi terselenggaranya penelitian ini.
3. Seluruh staf Laboratorium Ilmu Hayati Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan bantuan selama kami melakukan penelitian.
4. Seluruh staf Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan bantuan selama kami melakukan penelitian.
5. Seluruh staf bagian epidemiologi dan Penyakit Tropik Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama melakukan penelitian.

Kami menyadari bahwa laporan akhir penelitian ini masih jauh dari sempurna dan memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu segala masukan dan saran yang sifatnya membangun sangat kami harapkan demi kesempurnaannya sehingga dapat menambah pengetahuan dan wawasan bagi kami maupun para pembaca sekalian.

Semarang, Oktober 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	12
IV. METODE PENELITIAN.....	13
V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	24
DAFTAR PUSTAKA.....	25
LAMPIRAN.....	27

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Pembuatan larutan senyawa uji (ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat) dengan menggunakan pelarut media RPMI 1640.....	17
Tabel 2. Ekspresi p53 sel HeLa kontrol dan dengan perlakuan ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat konsentrasi 10 ug/ml.....	21
Tabel 3. Pengkategorian sel HeLa yang mengekspresikan protein p53 positif, baik kontrol atau dengan perlakuan ekstrak metanol ubi rambat dan buah makasar.....	21
Tabel 4. Lokasi ekspresi protein p53 positif pada sel HeLa kontrol dan dengan perlakuan ekstrak metanol buah makasar dan ubi rambat.....	22

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Foto mikroskopis sel Hela tanpa perlakuan (kontrol) dengan Pengecatan imunohistokimia yang diperiksa dibawah mikroskop cahaya (perbesaran 40 x 10).....	20
Gambar 3. Foto mikroskopis sel Hela dengan perlakuan ekstrak metanol ubi rambat dan buah makasar pada konsentrasi 10 ug/ml dengan pengecatan imunohistokimia yang diperiksa di bawah mikroskop cahaya (perbesaran 40 x 10).....	20

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Permasalahan

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan dunia baik di negara berkembang maupun negara maju. Dalam laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO) disebutkan bahwa 12% kematian yang terjadi dari 50 juta kematian dalam tahun 1997 disebabkan oleh kanker. Sebesar duapertiga dari jumlah tersebut terjadi di negara berkembang (WHO, 1998). Lebih jauh dilaporkan oleh *America Cancer Society* sekitar 1500 orang setiap hari meninggal karena kanker (Anonim, 1995). Menurut WHO (1998), kanker merupakan penyebab kematian nomor dua setelah kardiovaskuler diantara penyakit tidak menular (*non communicable disease* = NCD).

Berdasarkan hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1995, di Indonesia kanker merupakan penyebab kematian nomor delapan dengan kecenderungan adanya peningkatan angka insiden dari tahun ke tahun, yang diperkirakan mencapai kurang lebih 100 per 100.000 penduduk (Soemantri et al., 1995; Sibuea et al., 2000). Di Indonesia jumlah penderita kanker terus bertambah dari 3,8 % pada tahun 1990 menjadi 4,1% pada tahun 1995 (Depkes, 1997). Di Jawa Tengah dan sekitarnya, dilaporkan penderita kanker yang tercatat secara medis hanya penderita yang telah mencapai stadium lanjut, penderita kanker yang belum mencapai stadium tersebut masih tersembunyi di populasi masyarakat dan merupakan kelompok yang jumlahnya jauh lebih besar dan dari tahun ke tahun jumlahnya semakin bertambah (Soebroto, 1999). Kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker serviks dengan frekuensi relatif 29,63% (Prajatmo et al., 1999). Kanker serviks telah menjadi penyebab kematian kedua setelah kanker payudara (Longo, 1998).

Bagi kebanyakan orang menerima diagnosis kanker hampir serupa dengan menerima vonis kematian, karena masalah pembiayaan pengobatan kanker yang sangat mahal dan harus membiayai sendiri pengobatannya (Sutojo, 2001). Berbagai cara penyembuhan telah dilakukan untuk melawan kanker seperti pembedahan, penyinaran, kemoterapi dan imunoterapi namun demikian masing-masing cara mempunyai kelemahan sendiri sehingga pengobatan kanker belum memuaskan hingga saat ini

(Hoffman, 1999). Obat anti kanker yang ideal seharusnya dapat membunuh sel kanker tanpa membahayakan jaringan sehat dan nyatanya belum ditemukan obat yang memenuhi kriteria demikian, sehingga penggunaan klinik harus dengan pertimbangan untung dan rugi yang baik (Katzung, 1998). Penggunaan kemoterapi antikanker belum memberikan hasil optimal karena obat tersebut bekerja tidak spesifik. Masalah lain dalam kemoterapi adalah timbulnya sel kanker yang resisten terhadap antikanker tersebut yang membuat antikanker tersebut tidak sensitif lagi. Dengan demikian usaha menemukan antikanker yang lebih spesifik dan sensitif sangat diperlukan.

Dari aspek farmakologi salah satu upaya yang sudah dirintis sejak jaman dulu adalah pemanfaatan fitofarmaka, menggali kandungan zat/unsur kimiawi dalam tumbuh-tumbuhan yang potensial dapat dipakai sebagai obat antikanker. Cukup banyak obat antikanker yang bersumber dari tumbuh-tumbuhan yang telah diteliti secara cermat dan dipatenkan yang berdampak positif dalam penanggulangan berbagai jenis kanker. Berbagai anti kanker yang ada saat ini merupakan hasil pengembangan dari tanaman obat seperti vinka alkaloida, taksan, kamptotesin yang berasal dari tanaman antara lain : *Catharantus roseus*, *Taxus brevivolia*, dan *Camptotheca acuminata* dari Cina (Hoffman, 1999).

Indonesia sebagai salah satu pusat keanekaragaman hayati dunia sangat kaya akan tumbuhan berkhasiat pengobatan. Lebih dari 9000 spesies tanaman diduga memiliki khasiat pengobatan. Banyak tanaman obat tersebut diyakini memiliki khasiat untuk penyakit tertentu dan sebagai alternatif pengobatan berbagai penyakit, walaupun secara ilmiah belum banyak dibuktikan kebenarannya (Agoes et al., 2000). Beberapa tanaman obat diantaranya telah digunakan secara empiris oleh masyarakat secara tradisional untuk mengobati kanker , misalnya: buah makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr dan ubi rambat (*Ipomea batatas* (L.). Namun demikian bukti ilmiah mengenai efek antikanker tanaman tersebut belum banyak diungkapkan.

Brucea javanica (L) Merr (Buah makasar) merupakan salah satu tanaman yang digunakan di Indonesia sebagai obat tradisional untuk berbagai penyakit. Buah yang telah masak oleh masyarakat digunakan sebagai obat disentri, sakit perut , koreng dan penurunan panas. Sedangkan di Cina dan Afirika, tanaman ini digunakan sebagai obat kanker. *Ipomea batatas* (L) atau Ubi rambat merupakan tanaman yang banyak digunakan oleh

masyarakat sebagai antikanker (Barton, 1996). Tanaman-tanaman tersebut terbukti mengandung golongan senyawa aktif yang dikenal mempunyai aktivitas sitotoksik seperti bruseantin , bruseantinol dalam *B. javanica* (L) Merr dan ipomeanol dalam *I. batatas* L. Namun hingga saat ini mekanisme kerja senyawa ini sebagai antikanker belum diketahui.

Kematian sel kanker secara alamiah bisa disebabkan karena berfungsinya kembali mekanisme perbaikan DNA atau terjadinya apoptosis. Mekanisme perbaikan DNA pada gen p53 berlangsung pada fase G1 yang dapat menimbulkan fungsi normal gen p53. Gen p53 mengkode protein p53, yang akan terekspresi sedikit pada sel normal. Tetapi jika terdapat kerusakan DNA, akan terjadi peningkatan ekspresi protein p53 secara cepat yang akan menginduksi fase istirahat pada siklus sel untuk memperbaiki kerusakan DNA tersebut. Jika kerusakan tersebut tidak dapat diperbaiki, protein p53 tersebut akan menginduksi terjadinya apoptosis. Jadi dikatakan bahwa protein p53 berfungsi sebagai penekan proliferasi sel dan menghambat transformasi ke arah keganasan (Soussi dkk., 1990).

Penelitian untuk mengkaji aktivitas antikanker dari tanaman yang diduga mempunyai khasiat antikanker penting dilakukan dalam usaha mencari dasar ilmiah penggunaan tanaman tersebut untuk pengobatan kanker oleh masyarakat. Agar penggunaan obat atau tanaman obat menjadi rasional, harus didasarkan pada patofisiologi kanker serta mekanisme kerja obat dalam mengobati kanker. Disamping itu mekanisme kematian sel kanker juga perlu diketahui , salah satunya dengan melihat pengaruh ekstrak metanol *B.javanica* (L) Merr dan *I.batatas* (L) terhadap ekspresi gen p53 yang merupakan salah satu gen penekan tumor.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan pada informasi-informasi diatas maka aktivitas ekstrak metanol buah makasar (*B.javanica* (L) Merr) dan ubi rambat (*I.batatas* (L)) sebagai antikanker perlu dibuktikan secara *in vitro* pada sel kanker, sebagai upaya menemukan obat baru untuk kanker. Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini diarahkan untuk menjawab permasalahan-permasalahan sebagai berikut :